

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **11-286498**

(43)Date of publication of application : **19.10.1999**

(51)Int.Cl.

C07H 19/10
C07H 19/20
C07H 21/00
C12Q 1/68
G01N 33/50
G01N 33/58
// C12N 15/09
G01N 21/78

(21)Application number : **11-012975**

(71)Applicant : **ROCHE DIAGNOSTICS GMBH**

(22)Date of filing : **21.01.1999**

(72)Inventor : **MUEHLEGGER KLAUS
HOELTKE HANS-JOACHIM
BIRKNER CHRISTIAN
VON DER ELTZ HERBERT**

(30)Priority

Priority number : **93 4326466** Priority date : **06.08.1993** Priority country : **DE**

(54) NUCLEOTIDE LABELED BY INFRARED DYE AND USE THEREOF IN DETECTION OF NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new compound containing a carbocyanine group having absorption within a long wave length region, and enabling a general, simple and specific nucleic acid to be recognized.

SOLUTION: This new compound is the one of the formula [B is adenine or the like; Xn is a linkage having 4-20 atoms; Sig is

10,12-propylene-3,3,3',3'-

tetramethyl-1,1'-bis(3-sulfobutyl)-indotricarbocyanine-11-(4-amino)-phenoxy

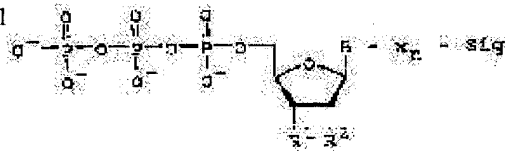
or the like; R1 and R2 are each H or the like], e.g. anhydrous-10,12-

propylene-3,3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis(3-sulfobutyl)-indotricarbocyanine-11

amino)-phenoxy-thiono-[8-(5-aminopentylamino)-2'-deoxy-adenosine-5'-

triphosphate]. The compound of the formula is obtained, for example, by

reacting an amino group-containing nucleoside-5'-triphosphate with an



LEGAL STATUS

* NOTICES *

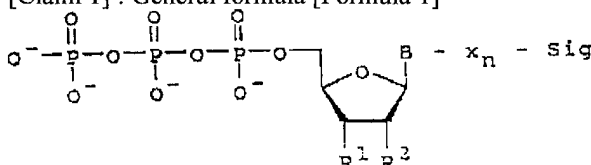
Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

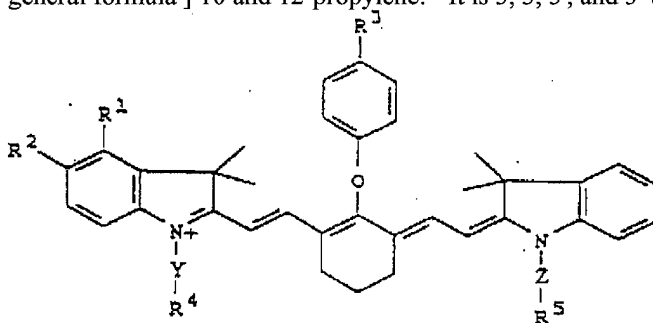
CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] : General formula [Formula 1]



SANCHIN the adenine the inside of a formula and whose B are heterocycle formula bases, a guanine, and HIPOKI [] -- 7-deazaadenine, a 7-deaza-guanine, 7-deaza - hypoxanthine, A 7-deaza-8-AZA-adenine, 7-deaza-8- Azaguanine, In a 7-deaza-8-AZA-hypoxanthine and a row A thymine, a cytosine, and a uracil are shown. Xn expresses the joint machine which has four to 20 atom, and Sig is [SU (3-sulfo butyl)-in DOTORI carbocyanine -11 -(4-friend NO)- : Phenoxy-CHIONO or general formula] 10 and 12-propylene. - It is 3, 3, 3', and 3'-tetramethyl. - They are 1 and 1'-BI. [Formula 2]



(Among a formula, R1 and R2 are H, or R1 and R2 become a 1 clue, and they form the benzene ring condensed to the benzoin gold ring. R3) It is H when combination with a nucleotide minds R5 part. It is -NHCS-, when it is and combination minds R3 part. R4 and R5 -- respectively -- independent -SO3H Or -SO3- It is an alkylene machine. it is -- Y -- the line of carbon numbers 3-5 -- an alkylene machine -- it is -- Z -- the line of carbon numbers 3-5 -- or the case where combination minds R5 part -- R5 -NHCS- it is -- Z -- carbon the line of 3-8 numbers -- an alkylene machine -- it is -- R4 -SO3H Or -SO3- it is -- Y -- the line of carbon numbers 3-5 -- it is an alkylene machine Expressing the carbocyanine shown, R1 and R2 express H and/or OH, respectively. Nucleoside-5'-3 phosphoric acid expressed.

[Claim 2] How to incorporate this compound to a nucleic acid by using a compound according to claim 1 as a substrate of DNA polymerase.

[Claim 3] How to incorporate this compound to a nucleic acid by using a compound according to claim 1 as a substrate of RNA polymerase.

[Claim 4] How to carry out the indicator of the nucleic acid by using a compound according to claim 1.

[Claim 5] How to detect a nucleic acid by using a compound according to claim 1.

[Claim 6] How to carry out sequencing of the DNA by using a compound according to claim 1.

[Claim 7] in situ The method according to claim 4 to 6 of using a compound according to claim 1 in hybridization.

[Claim 8] The method according to claim 7 of performing hybridization on a film.

[Claim 9] The method according to claim 7 of performing hybridization in a solution.

[Claim 10] The method according to claim 9 of performing hybridization in the solution in a microtiter plate.

[Claim 11] The method according to claim 5 by which the hybrid by which the indicator was carried out is detected by suitable laser diode and a suitable detector.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] this invention relates to those use for the indicator of a nucleic acid, detection, and sequencing at the nucleoside-5'-3' phosphoric-acid and phospho RUAMIDAITO, and nucleoside -5' that has carbocyanine machine in base portion or Lynn atom preferably-3' phosphoric acid and phospho RUAMIDAITO which have the fluorescence residue which has absorption in a long wavelength field, and a row.

[0002]

[Description of the Prior Art] A nucleic acid is very important in a living thing as the support or the carrier of genetic information. F. Miescher Since discovery of the nucleic acid to depend, the nucleic acid has stimulated a wide range scientific interest, and has resulted in the elucidation of those functions, structure, and the mechanism of an operation. It became possible to pursue combination with a new gene in recent years as the knowledge of these fundamental molecular biology-mechanisms increased. This technology opened new possibility in plant breeding to the medical diagnosis and the medical treatment row.

[0003] These interrelations are understood, and the means by which it is indispensable in order to solve the problem is [being / of a nucleic acid / detection, and] also so now about specific detection of a nucleic acid, and the array of a nucleic acid, i.e., the primary structure of a nucleic acid, if it puts in another way. These molecules act mutually, i.e., the specific detectability of a nucleic acid is based on the property of forming a hybrid, by forming a base pair through other nucleic acids and hydrogen bond. Therefore, a complementary nucleic acid (target) is detectable by using the nucleic acid (probe) to which the indicator was carried out namely, to which the directions machine (indicator groups) was given by suitable technique.

[0004] The decision of the primary structure (array) of a nucleic acid, i.e., the determination of the array of a heterocycle formula base, is made with sequencing technology. The knowledge of this array is also a requirement in molecular biology-research and work technology for the specific use which defined the target of a nucleic acid. Moreover, finally sequencing also uses the principle of the specific hybridization between nucleic acids. Moreover, as mentioned above, the nucleic-acid fragment by which the indicator was carried out is also used for sequencing.

[0005] The suitable indicator of the above thing to a nucleic acid of it being an indispensable condition also for which the method of detection is clear. The radioactive indicator using suitable isotopes, such as ^{32}P or ^{35}S , was especially used for sequencing in the early stage already. however, : with the clear fault of using a radioactive reagent -- the troublesome disposal radioactive waste was managed by whose facility and permission row of the special room is required for such operation The reagent for radioactive indicators is expensive. Since the long term storage of such a sample by which the indicator was carried out has the short half-life of the above-mentioned nuclear species, it is impossible.

[0006] Therefore, these serious faults are avoided in recent years, namely, many attempts for escaping a radioactive indicator have been made. In doing so, the high sensitivity of this type of indicator must be held as much as possible. In fact, the big improvement has been made in this case [the thing of reference of for example, Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules, C.Kessler (editor), and 1992].

[0007] It is proved that haptens (a biotin or digoxigenin), enzymes (the alkaline phosphatase or peroxidase), or especially fluorescent dyes (a fluorescein or rhodamine) were successful as a nonradioactive directions molecule (non-radioactive indicator molecules) in a number of inside. For example, although the indicator in haptens, such as digoxigenin, reaches the range of the sensitivity of radioactivity, direct detection of an analogous hapten indicator nucleic acid is impossible on a radioactive indicator. For example, the next detection reaction attained by the antibody reaction is required. Some steps, i.e., much time, and the costs on economy are required for this indirect detection. Since protein is used for the detection reaction, in order to reduce un-specific combination, the solid phase (a film, microtiter plate) by the prevention step and the washing step extraordinarily needs to be processed. Nevertheless, since disturbance background dyeing (interfering background colouration) resulting from un-specific protein combination occurs, the sensitivity of this 2 step detection is usually restricted. The same thing is fundamentally applied to a direct enzyme-indicator nucleic acid.

[0008] If a fluorescent-labeling nucleic acid is used, this fault of the indirect detection mentioned above will not arise. By exciting fluorescence in principle, direct detection is possible, and it can visualize and can measure with suitable equipment (a fluorescence microscope, scanner). However, the autofluorescence (autofluorescence) of the petrographic constituent of the biomaterial like a cell and coloring matter, a fat, and protein examined blocks also in this case. If especially the solid support matter (for example, nylon film) is used, such disturbance will arise according to the peculiar fluorescence, and detection will

be complicated, or it will bar.

[0009] In order to solve these problems in principle, excitation and discharge are using the color to produce, larger wavelength field, i.e., near-infrared (NIR) field, than 680nm. Above-mentioned disturbance fluorescence is meaningless under such environment. I hear that a still more important advantage can use considerably durable cheap laser diode for excitation, and there is.

[0010] It is the theme of the application (US4,729,947) which follows, for example, has the technology of DNA sequencing by the photoelectric photometry using the laser and the sensor after fluorescent labeling of a DNA fragment. By this method, it is used by the technique in which the oligonucleotide by which the indicator was carried out with IR color is well-known as a primer in the so-called Sanger method, and behavior of them is carried out as a starter for composition of a new complementary nucleic-acid chain in the method of starting. However, fault of this method -- It is although it is dependent on DNA by which sequencing is carried out. -- That is [it must many times newly compound a specific indicator primer for every ****], I hear that many such indicator primers must be compounded, and it is. Since this composition of an oligomer primer by which the indicator was carried out must compound a non-indicator oligonucleotide and combine a signal (reporter) machine in the first place chemically in the second reaction continuously, it is expensive and also requires time.

[0011]

[The field which invention tends to solve] Therefore, the purpose of this invention is to manufacture the compound which makes the indicator of a specific nucleic acid possible generally and simply.

[0012]

[Means for Solving the Problem] It became clear that an indicator can be simultaneously carried out to newly compound a nucleic acid and shave it by making the nucleoside triphosphate by which now the indicator was carried out appropriately incorporate using a polymerase. In the field of a deoxyribonucleic acid (DNA) This Nick translation [Rigby, P.W. et al., (1977) J.Mol.Biol.113, 237] and random primer indicator method [Feinberg, A.P.& Vogelstein, B.Anal(1984).Biochem.137, and 266] It is attained by using and making a deoxy nucleotide incorporate by DNA polymerase, and, in the case of a ribonucleic acid, is attained by using RNA polymerase and a ribonucleotide along with the line of a translation. The further method of carrying out the indicator of the nucleic acid is based on the so-called 3' tailing reaction (tailing reaction) accompanied by assistance of a terminal transferase and RIBO, or deoxyribonucleoside 3 phosphoric acid.

[0013] However, nucleoside triphosphate to which directions molecules, such as a fluorescein or digoxigenin (MW 332 or 390), were given -- It is if it contrasts with those natural substrates. -- The reception as a substrate by the polymerase is relatively imperfect, and the incorporation to the nucleic acid compounded newly is relatively imperfect (Hoeltke and H.-J. s (1990) Biol.Chem.Hoppe-Seyler 371, 929).

[0014] Therefore, it is not expectable that the directions molecule of the amount of macromolecules (800-1000) is received by the polymerase as a substrate, and is incorporated further further by the nucleic acid. It is hardly likely to happen that these molecules to which the severe structure of a demand was given spatially are converted by the polymerase for strong steric hindrance. Especially now, the surprising nucleoside triphosphate by which the indicator was carried out with the infrared color was received by polymerases, such as T7 DNA polymerase, as a substrate, and being incorporated by the nucleic acid was found out. Therefore, the compound by this invention is new.

[0015] The further purpose of this invention was finding out the method of making it possible to detect directly the nucleic acid by which the indicator's was carried out such using the indicator nucleic acid by the above-mentioned this invention in the solutions for example, on solid supports, such as for example, a nylon film, in a microtiter plate, etc. As already described above, the fault of being with fluorophores, such as a fluorescein or a tetramethyl rhodamine, and carrying out the indicator of the nucleic acid is that the peculiar fluorescence of the support matter blocks measurement of the fluorescence of the fluorophore.

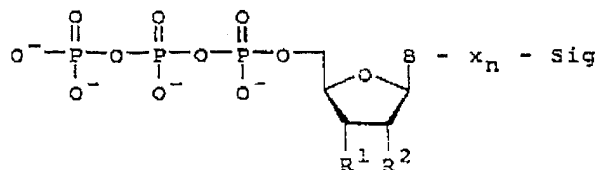
[0016] However, since measurement wavelength is in a near infrared region when the nucleoside triphosphate which carried out the indicator with IR color by this invention is used for the indicator of a nucleic acid, such disturbance is already meaningless. The advantage of the nucleic-acid detection by the hybridization of an original position is well-known. In this method, an indicator sample or a probe is directly detected by the fluorescence microscope, or, in the case of a hapten indicator, is detected by the further operation step in an immunological reaction (ELISA). such visualization -- usually -- a sample -- for example, a nylon film top -- or it is attained by fixing in the liquid uniform phase in a microtiter plate The step of this addition takes time considerably and is expensive. Therefore, to skip this step is desired.

[0017] By the possibility of exciting directly IR-fluorescent-labeling nucleic acid by suitable laser diode, and the non-susceptibility of the detection to the autofluorescence of the above-mentioned support matter, it is easy and the most efficient equipment can be used to costs. An immunological detection reaction is omissible. IR-indicator nucleic acid is simply detected by combined use of a suitable scanner, or the laser/detector accompanied by assistance of a microtiter plate reader with an optical means.

[0018] If the nucleoside 5'-3 phosphoric acid which carried out the indicator by the infrared fluorophore by this invention when summarized is used as a polymerase substrate, the use is in situ which is [in / this combination / again / become possible to detect the nucleic acid by which the indicator was carried out in this way to the direct enzyme-incorporation to a nucleic acid, and the row for sequencing, and] new, and makes a part of this invention simultaneously. Hybridization is also permitted.

[0019] this invention is general formula:. [0020]

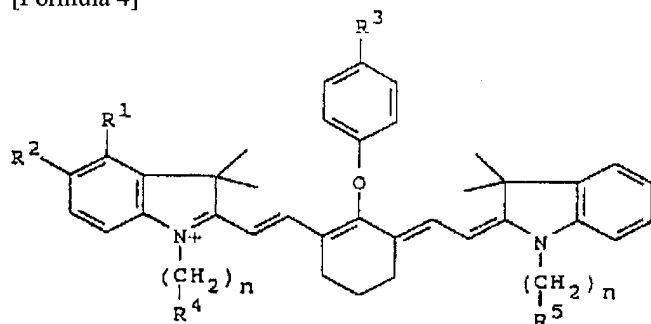
[Formula 3]



[0021] the adenine the inside of a formula and whose B are heterocycle formula bases, a guanine, and a hypoxanthine -- 7-deazaadenine, a 7-deaza-guanine, 7-deazahypoxanthine, A 7-deaza-8-AZA-adenine, 7-deaza-8-azaguanine, a thymine, a cytosine, and a uracil are shown in a 7-deaza-8-AZA-hypoxanthine and a row, X expresses the joint machine of n= 4 to 20 atom, Sig expresses a fluorescence molecule with the excitation wavelength of 650-800nm, and R1 and R2 express H and/or OH, respectively The nucleoside-5'-3 phosphoric acid expressed is offered.

[0022] In one mode of this invention, B in the above-mentioned general formula is as having mentioned above, X expresses the joint machine of n= 10 to 15 atom preferably, and Sig is general formula:.

[0023] [Formula 4]

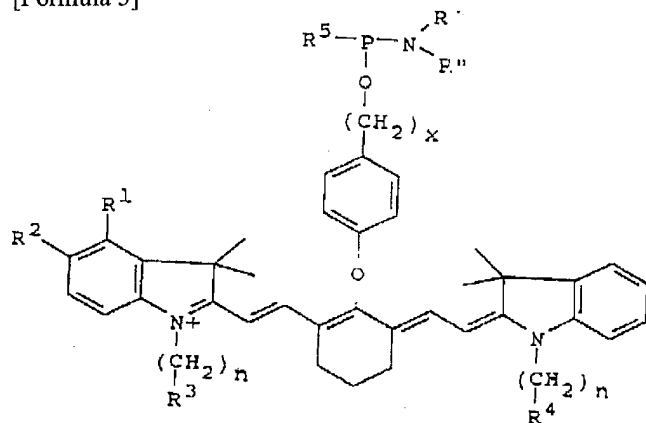


[0024] Or [both] a phenyl residue is expressed. the inside of a formula, and R1 and R2 -- H -- R3 When combination with a nucleotide minds R4 part, it is H, and it is -NHCS- when combination minds R3 part. R4 and R5 when the alkyl sulfonyl of n=3-5 is shown, respectively or combination minds R4 part, R4 shows -NHCS- of n=3-8 and R5 shows the alkyl sulfonyl of n=3-5 The carbocyanine shown is expressed.

[0025] this invention is use of the above-mentioned compound for detecting use of the above-mentioned compound for carrying out the indicator of the above-mentioned compounds as a substrate of DNA polymerase and those use, the above-mentioned compounds as a substrate of RNA polymerase and those use, and the nucleic acid, and a nucleic acid again, use of the above-mentioned compound in DNA sequencing, and in situ. It is related with use of the above-mentioned compound used in hybridization. As for hybridization, it is good to carry out in the solution on a film, in a solution, or in a microtiter plate.

[0026] The hybrid by which the indicator was carried out is detectable with suitable laser diode and a suitable detector. Furthermore, this invention is general formula:.

[0027] [Formula 5]

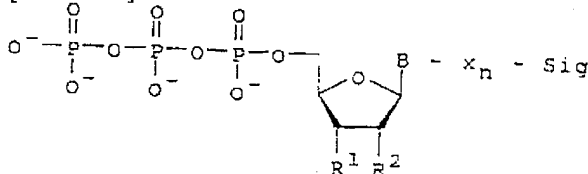


[0028] (-- the inside of a formula, and R1 and R2 -- H -- or both phenyl residues are expressed, R3 and R4 show the alkyl sulfonyl of n=3-5, respectively, R5 shows a methoxy or 2-cyanoethoxy, R' and R'' show ethyl or an isopropyl, respectively, and X shows 1-10 The compound expressed with) is offered. this invention is use of the above-mentioned compound used for the oligonucleotide composition by the phosphorousaminodite method, and 5' of an oligonucleotide. - It is related also with use of the above-mentioned compound for an indicator.

[0029]

[Embodiments of the Invention] : The general formula of this invention [0030]

[Formula 6]



[0031] It comes out, and the nucleoside 5'-3 phosphoric acid expressed leaves the nucleoside which is not embellished, and is manufactured by the well-known method. The case of these, i.e., a pyrimidine nucleoside, a uridine, thymidine, and a cytidine, In the case of a purine nucleoside, and 7-deazapurine and the 7-deaza-8-azapurine nucleoside corresponding to it in an adenosine and a guanosine, and a row It is chemically embellished with suitable technique in the position of C-5 or C-6 (pyrimidine), C-8 (pudding), C-8 (3-deazapurine), C-7, or C-8 (7-deazapurine), and, finally is 5'. - It phosphorizes.

[0032] It is [an ornamentation machine] convenient to consist of the first classes in an end or the second class amino groups which may be replaced by the spacer and the activated suitable fluorescent dye (for example, form of an isothiocyanate or N-hydroxysuccinimide ester) of suitable length. the form, i.e., the amino group and the form where it often reacts, where such a fluorescent dye was activated -- it is preferably used as an isothiocyanate After the reaction is completed, covalent bond of the fluorophore is carried out to the ornamentation machine of a nucleotide through a NHCS basis.

[0033] thus, the phosphorylation of the embellished nucleoside -- reference [, i.e., Yoshikawa, M. et al. -- it is carried out by making it react with a phosphorus trichloride according to the well-known method indicated by Tetrah.Lett.50 and 5065], making 1 phosphate generate, making it react with a pyrophosphoric acid subsequently, and making desired 5'-3 phosphate generate (1967) Moreover, as a method of replacing with it, direct ornamentation of the nucleoside 5'-3 phosphoric acid made to generate beforehand is also possible.

[0034] A fluorophore is a near infrared region, i.e., the compound which has absorption among 600-800nm. For example, 630nm - 780nm compounds, such as a carbocyanine, are desirable. As already described above, the further method based on in addition to the above-mentioned method for making an indicator nucleoside incorporate using a polymerase] the so-called use of an indicator oligonucleotide and a primer is common. As reference was already made, the usual composition of these molecules in multistep reaction requires time extremely. In this method, after oligonucleotide composition is completed, in an additional step, you have to combine a signal machine with the five prime end of oligomer. Since actual oligonucleotide composition is performed by the automatic synthesizer unit, to also already perform the step of combination of a signal machine within the synthesizer unit is strongly desired for the bird clapper possible. Since this oligonucleotide composition consisted of combining a monomer composition unit little by little and so-called nucleoside phospho RUAMIDAITO, the further purpose of this invention was developing fluorophore phospho RUAMIDAITO which makes direct incorporation of a signal machine possible as the last step in automatic oligonucleotide composition. Such NIR-color-phospho RUAMIDAITO is not known until now, but is new in invention.

[0035] The following example explains this invention to a detail further.

[0036]

[Example] example 15-(3-amino allyl compound)- derivative of 2 '- deoxyuridine -5'-3 phosphoric-acid ** Langer ** -- it compounded according to Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1981) 78 and the publication of 6635

The example 2 anhydrous-11-phenoxy -10, 12-propylene [-(3-aminopropyl)- CHIONO-[5-] - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl - 4 5-bends INDO-in DOTORI carbocyanine-1-(4-sulfo butyl)-1' 3 '5-bends INDO-1-(4-sulfo butyl)-1 [- tetramethyl-4,]'- (3-amino allyl-compound)-2 -- '- deoxyuridine -5' -- 3 phosphoric-acid] dimethylformamide 1ml -- the inner anhydrous-11-phenoxy -10 and 12-propylene - 3, 3, and 3' -- (3-iso thio cyano propyl)-in DOTORI carbocyanine Na salt 50mg A solution While adding in the solution of 5-amino allyl-compound-dUTP-Li4 33mg (60micromol) in 0.1M boric-acid sodium buffer-solution (pH 8.5) 2ml and shading the reaction mixture. It was left at the room temperature for about 15 hours. Then, according to filter electrophoresis (the 0.05M sodium-citrate buffer solution, pH 5), most starting materials had reacted. In order to isolate the desired matter, reaction mixture was diluted with 50ml of ****, and the ion exchange column containing chloride type DEAE Sephadex A-25 was filled with the solution of a dark green color. The product was eluted from the column in the straight-line gradient of water to 1MLiCl, the product fraction was condensed by reduced pressure, and it desalted by the reversed phase chromatography on RP18 matter. 6micro mol (10%) of desired 3 phosphate was obtained after freeze drying.

[0037] Spectrum data: Emissionmax 786 nm, 720 nm (shoulder), 238 nm example 3 anhydrous - 10, 12-propylene - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl -1 and 1'-screw (3-sulfo butyl)-in DOTORI carbocyanine-11-(4-AMINO)-phenoxy-CHIONO-[-- 8-(5-amino pentylamino)- 2 '- deoxyadenosine -5'-3 phosphoric acid --] "IRD-dATP" This derivative 8-amino pentylamino-dATP 38mg (60micromol) and anhydrous [- 1 1'-screw -11 (3-sulfo butyl) / -(4-iso thio cyano)- from 50mg (60micromol) of phenoxy-in DOTORI carbocyanine Na salts] - 10, 12-propylene - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl It prepared according to the method stated in the example 2. Compound 3micromol It was obtained.

[0038] Spectrum data: Emissionmax 770 nm, 697 nm (shoulder), 279 About 3micro [of use template DNA of IRD-dATP as a substrate of nm example 4T7-DNA polymerase] g, it is the reaction buffer solution. (200mM tris-HCl, pH 7.5 and 100 mM MgCl2, and 250mM NaCl) 2microl and M13/pUC Primer 1pM and H2O 7microl It incubated for 15 minutes at 37 degrees C

in mixture.

[0039] DTT 1microl (100mM), indicator mixture (it is 1microM about IRD 40-dATP 10microM, dCTP, dGTP, and dTTP, respectively) 2microl, and H2O 1microl And 2micro [of T7-DNA polymerase] 1 (2.5 U/mul) was added for the indicator reaction, and it incubated for 10 minutes at the room temperature. Then, in order to use it for DNA sequencing, it is termination mixture (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Termination was performed by adding.

The example 5 anhydrous-11-phenoxy -10, 12-propylene [-(3-aminopropyl)- CHIONO-[5-] - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl - 4 5-bends INDO-in DOTORI carbocyanine-1-(4-sulfo butyl)-1' (3-amino allyl-compound)-uridine-5'-3 phosphoric-acid] Make this compound be the same as that of an example 2 from 5-amino allyl-compound-UTP (it prepared according to the example 1), and a corresponding isothiocyanate. It compounded.

[0040] Spectrum data are in agreement with the 2'-deoxy compound of an example 2.

Example 6 anhydrous [- 1 1'-screw (3-sulfo butyl)-India-TORIKARUBO cyanine-11-(4-AMINO) phenoxy-CHIONO-[5-(3-amino allyl compound)-2',] - 10, 12-propylene - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl 3 '- dideoxyuridine -5'-3 phosphoric-acid] The derivative of step ("IRD-ddUTP") 1:2' and 3 '- dideoxyuridine -5'-3 phosphoric-acid ** Mind commercial 2' and the unstable diazonium derivative which leaves 3 '- dideoxy-cytidine -5'-3 phosphoric acid (BERINGA Mannheim) from deaminating with a NaNO2/acetic acid. It compounded.

[0041] step 2:5-(3-amino allyl compound)- the compound of 2' and 3 '- dideoxyuridine -5'-3 phosphoric-acid ** -- Langer and others -- following -- 2' and 3' -- it prepared like the example 1 through 5-mercury derivative of - dideoxy-UTP Step 3: "IRD-ddUTP" This dideoxy derivative was obtained by making 5-amino allyl-compound-ddUTP and the isothiocyanate corresponding to it react according to an example 2.

[0042] The spectrum data is in agreement with the thing of the 2'-deoxy compound of an example 3.

Example 7 anhydrous [- 1 1'-screw (3-sulfo propyl)-India-TORIKARUBO cyanine-11-[(4-ethoxy) phenoxy-O-(2-cyano ethyl)-N,] - 10, 12-propylene - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl N-diisopropyl-phospho RUAMIDAITO50ml -- in a round bottom flask The anhydrous-11-(4-hydroxyethyl) phenoxy -10, 12-propylene [425mg (0.5mmol) .] - 3, 3, 3', 3'-tetramethyl - 1, Na salt of 1'-screw (3-sulfo propyl)-in DOTORI carbocyanine-hydroxide It dissolves in dryness acetonitrile 5ml, and is ethyl diisopropylamine. 0.275ml (1.6mmol) It added. Subsequently, chloro-beta-cyanoethoxy - Dropping addition was carried out within about 3 minutes, stirring N and N-diisopropyl friend NOHOSU fan 0.125ml under nitrogen. Furthermore, it stirred for 30 minutes at the room temperature, next 10ml of NaHCO3 solution was added 5%, and extraction was performed twice continuously, using dichloromethane about 10ml respectively. The organic collected phase is dried on a sodium sulfate, distillation removes a solvent, and they are a move solvent dichloromethane / ethyl acetate / triethylamine about the residue. 45:45:10 It used and applied to the chromatography in silica gel.

[0043] Yield It was 480mg (it is 88.7% to a theoretical value).

TLC Rf(silica gel, above-mentioned move solvent) =0.431 P-NMR(d6DMSO):149 And 153 ppm (two diastereomers)

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-286498

(43) 公開日 平成11年(1999)10月19日

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号
C 0 7 H 19/10
19/20
21/00
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/50

F I
C 0 7 H 19/10
19/20
21/00
C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N 33/50 P

審査請求 有 請求項の数11 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-12975
(62) 分割の表示 特願平7-506207の分割
(22) 出願日 平成6年(1994)7月30日
(31) 優先権主張番号 P 4 3 2 6 4 6 6 : 2
(32) 優先日 1993年8月6日
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 591215177
ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエ
ムペーハー
ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム,
サントホファーシュトラッセ 116
(72) 発明者 ミューレッガー, クラオス
ドイツ連邦共和国 デー-82398 ポー
リンク レメルシュトラッセ 7番地
(72) 発明者 ヘルトケ, ハンス-イェーチム
ドイツ連邦共和国 デー-82327 チュ
トツィンク ハイドンシュトラッセ 5番
地
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)
最終頁に続く

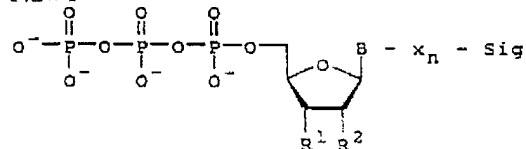
(54) 【発明の名称】 赤外染料で標識されたヌクレオチド及び核酸検出におけるそれらの使用

(57) 【要約】

【課題】 核酸の標識を可能にする化合物を製造する。

【解決手段】 一般式:

【化1】



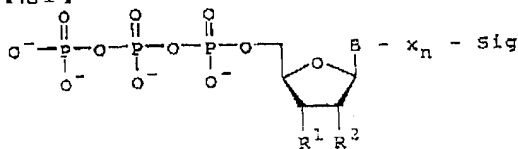
(式中、Bは複素環式塩基を示し、X_nは4~20原子を有する結合基を表し、Sigは10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-1,1'-ビス(3-スルホプロピル)-インドトリカルボシアニン-11-(4-アミノ)-フェノキシチオノまたはカルボシアニンを表し、R¹およびR²は、それぞれHおよび/またはOHを表す。)で表されるヌクレオチド-5'-三リン酸。

1

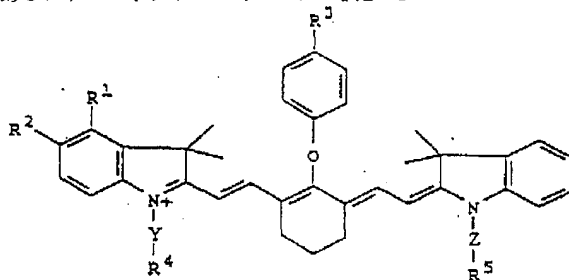
【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式：

【化1】



(式中、Bは複素環式塩基であるアデニン、グアニン、*10 【化2】



(式中、R¹およびR²はHであるか、またはR¹およびR²が一緒になってベンゾインドール環に縮合したベンゼン環を形成し、

R³は、ヌクレオチドとの結合がR⁵部位を介する場合はHであり、結合がR³部位を介する場合は-NHCS-であり、

R⁴およびR⁵はそれぞれ独立に-SO₃H または-SO₃⁻ であり、

Yは炭素数3～5の線状アルキレン基であり、

Zは炭素数3～5の線状アルキレン基であり、または、結合がR⁵部位を介する場合はR⁵は-NHCS-であり、Zは炭素数3～8の線状アルキレン基であり、R⁴は-SO₃H または-SO₃⁻ であり、Yは炭素数3～5の線状アルキレン基である。)で示されるカルボシアニオンを表し、R¹およびR²は、それぞれHおよび/またはOHを表す。)で表されるヌクレオシド-5'-三リン酸。

【請求項2】DNAポリメラーゼの基質として請求項1記載の化合物を使用することにより、該化合物を核酸に取り込む方法。

【請求項3】RNAポリメラーゼの基質として請求項1記載の化合物を使用することにより、該化合物を核酸に取り込む方法。

【請求項4】請求項1記載の化合物を使用することにより、核酸を標識する方法。

【請求項5】請求項1記載の化合物を使用することにより、核酸を検出する方法。

【請求項6】請求項1記載の化合物を使用することにより、DNAを配列決定する方法。

【請求項7】in situ ハイブリッド形成において請求項1記載の化合物を使用する、請求項4～6のいずれかに記載の方法。

2

*ヒポキサンチン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-グアニン、7-デアザ-ヒポキサンチン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-グアニン、7-デアザ-8-アザ-ヒポキサンチン、ならびにチミン、シトシンおよびウラシルを示し、

X_nは4～20原子を有する結合基を表し、

Sigは10,12-プロピレン-3,3',3'-テトラメチル-1,1'-ビス(3-スルホブチル)-インドトリカルボシアニオン-11-(4-アミノ)-フェノキシチオノまたは一般式：

【化2】

20*【請求項8】ハイブリッド形成を膜上で行う、請求項7記載の方法。

【請求項9】ハイブリッド形成を溶液で行う、請求項7記載の方法。

【請求項10】ハイブリッド形成をマイクロタイタプレート内の溶液で行う、請求項9記載の方法。

【請求項11】標識されたハイブリッドが適切なレーザーダイオードおよび検出器により検出される、請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】本発明は、長波長領域に吸収をもつ蛍光残基を有するヌクレオシド-5'-三リン酸及びホスホルアミダイト、好ましくはその塩基部分またはリン原子にカルボシアニオン基を有するヌクレオシド-5'-三リン酸及びホスホルアミダイト、ならびに核酸の標識、検出および配列決定のためのそれらの使用に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸は、遺伝情報の担体または伝達体として生物においてきわめて重要なものである。F. Miescher による核酸の発見以来、核酸は広範囲の科学的な興味を刺激し、それらの機能、構造および作用のメカニズムの解明に至った。これらの基礎的な分子生物学的メカニズムの知識が増えるにしたがって、近年、遺伝子の新しい組み合わせを追求することが可能になった。この技術は、例えば、医学的診断および治療ならびに植物育種において新たな可能性を開いた。

【0003】これらの相互関係を理解し、そしてその問題を解くために必須の手段は、核酸の検出、換言すれば核酸の特異的検出および核酸の配列すなわち核酸の一次構造に関するものであったし、現在もそうである。核酸

の特異的検出性は、これらの分子が相互に作用する、すなわち、他の核酸と水素結合を介して塩基対を形成することによりハイブリッドを形成するという特性に基づく。従って、適切な手法で標識された、すなわち指示基(indicator groups)を付与された核酸(プローブ)を用いることにより相補的な核酸(ターゲット)を検出することができる。

【0004】核酸の一次構造(配列)の決定、すなわち複素環式塩基の配列の決定は、配列決定技術によって行う。この配列の知識もまた、分子生物学的研究および作業技術において、核酸の目標を定めた特異的な使用にとって必要条件である。また、最終的に、配列決定は核酸相互の特異的ハイブリッド形成の原理をも利用する。また、上述したように、標識された核酸断片も配列決定に使用される。

【0005】以上のことから、核酸の適当な標識は、いずれの検出方法にとっても必須条件であるということは明白である。とりわけ、 ^{32}P または ^{35}S などの適当な同位体を用いる放射性標識は、すでに早期の段階で配列決定に使用されていた。しかしながら、放射性試薬を使用することの欠点が明らかである：そのような操作には特別の部屋の設備および許可ならびに放射性廃棄物の管理されたやっかいな処分が必要である。放射性標識用の試薬は高価である。そのような標識された試料の長期保管は上記核種の半減期が短いために不可能である。

【0006】したがって、近年、これらの重大な欠点を回避する、すなわち放射性標識から逃れるための多くの試みがなされてきた。そうすることにおいて、かかるタイプの標識の高い感度は可能なかぎり保持されなければならない。事実、この場合、大きな改善がなされてきた〔例えば、Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules, C. Kessler (編集者)、“Springer Verlag Berlin, Heidelberg” 1992を参照のこと〕。

【0007】ハプテン(ビオチンまたはジゴキシゲニンなど)、酵素(アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなど)または蛍光染料(フルオレセインまたはローダミンなど)は、特に数ある中で非放射性指示分子(non-radioactive indicator molecules)として成功していることが証明されている。例えばジゴキシゲニンなどのハプテンでの標識は放射能の感度の範囲に達するが、放射性標識に類似したハプテン標識核酸の直接的検出は不可能である。例えば、抗体反応によって達成される次の検出反応が必要である。この間接的な検出にはいくつかのステップ、すなわち多くの時間と、経済上の費用が必要である。その検出反応のためにタンパク質を使用するので、非特異的結合を低減するために阻止ステップおよび洗浄ステップによる固相(膜、マイクロタイタープレート)の特別な処理が必要である。それにもかかわらず、非特異的タンパク質結合に起因する妨害バックグラウンド染色(interfering background colouration)が

発生するため、この2ステップ検出の感度は、通常、制限される。根本的に同様のことが直接的酵素-標識核酸にあてはまる。

【0008】蛍光標識核酸を用いると、上述した間接的検出の該欠点が生じない。原則として蛍光を励起することにより直接的検出が可能であり、可視化して適当な装置(蛍光顕微鏡、スキャナー)で測定することができる。しかしながら、この場合も細胞および色素、脂肪、タンパク質といったような試験される生体材料の組織成分の自己蛍光 autofluorescence が妨害する。特に固体担体物質(例えば、ナイロン膜)を使用すると、その固有の蛍光によりそのような妨害が生じて、検出を複雑にするか、または妨げる。

【0009】原則としてこれらの問題を解決するには、励起および放出が680nmより大きい波長領域すなわち近赤外(NIR)領域で生ずる染料を使用することである。上述の妨害蛍光はこれらの環境下では無意味である。さらに重要な利点は、かなり耐久性のある安価なレーザーダイオードを励起に使用することができるということである。

【0010】従って、例えば、DNA断片の蛍光標識後のレーザーおよびセンサーを用いた光電測定によるDNA配列決定の技術がある出願(US 4,729,947)の主題である。この方法では、IR染料で標識されたオリゴヌクレオチドがいわゆるサンガー法におけるプライマーとして公知の手法で使用され、それらはかかる方法においては新しい相補的核酸鎖の合成のためのスターターとして挙動する。しかしながら、この方法の欠点は一配列決定されるDNAに依存するがー特異的標識プライマーを各場合ごとに幾度も新たに合成しなければならない、すなわちそのような標識プライマーを多数合成しなければならないということである。この標識されたオリゴヌクレオチドの合成は、第一に非標識オリゴヌクレオチドを合成し、続いて第二の反応においてシグナル(レポーター)基を化学的に結合しなければならないので、高価で時間もかかる。

【0011】

【発明が解決しようとする分野】従って、本発明の目的は、一般的で、簡単で、かつ特異的な核酸の標識を可能にする化合物を製造することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】今や、適切に標識されたヌクレオシド三リン酸をポリメラーゼを用いて取り込ませることにより核酸を新たに合成し、それと同時に標識することができるということが判明した。デオキシリボ核酸(DNA)の分野においては、これは、ニックトランスレーション法[Rigby, P.W. ら、(1977) J. Mol. Biol. 113, 237]およびランダムプライマー標識法[Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266]を用いてDNAポリメラーゼにより、デオキ

シヌクレオチドを取り込ませることによって達成され、リボ核酸の場合は、翻訳のラインに沿ってRNAポリメラーゼおよびリボヌクレオチドを用いることにより達成される。核酸を標識するさらなる方法は、ターミナルトランスフェラーゼおよびリボまたはデオキシリボヌクレオシド三リン酸の補助を伴ういわゆる3' テーリング反応 (tailing reaction) によるものである。

【0013】しかしながら、フルオレセインまたはジギキゲニン (MW 332または390) などの指示分子を付与されたヌクレオシド三リン酸は—それらの天然の基質と対比すると—ポリメラーゼによる基質としての受け取りが相対的に不完全であり、新しく合成された核酸への取り込みが相対的に不完全である (Hoeltke, H.-J. ら (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 929)。

【0014】従って、さらにいっそう高分子量 (800~1000) の指示分子がポリメラーゼにより基質として受け取られ、核酸に取り込まれることは期待できない。空間的に要求のきびしい構造が付与されたこれらの分子は強い立体障害のためにポリメラーゼによって転化されることはほとんど起こりそうもない。驚くべきことに、今や、赤外染料で標識されたヌクレオシド三リン酸はT7 DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼにより基質として受け取られ、核酸に取り込まれることが見いだされた。従って、本発明による化合物は新規である。

【0015】本発明のさらなる目的は、上述の本発明による標識核酸を用いて、そのように標識された核酸を、例えばナイロン膜などの固体担体上、あるいは例えばマイクロタイタープレート内などの溶液中で直接的に検出することを可能にする方法を見いだすことであった。すでに上記したように、フルオレセインまたはテトラメチルローダミンなどの発蛍光団をもちいて核酸を標識することの欠点は、担体物質の固有の蛍光が、その発蛍光団の蛍光の測定を妨害することである。

【0016】しかしながら、本発明によるIR染料で標識したヌクレオシド三リン酸を核酸の標識に使用すると、測定波長が近赤外領域にあるのでそのような妨害はもはや無意味である。本来の位置のハイブリッド形成による核酸検出の利点は公知である。かかる方法において、標識試料またはプローブは、蛍光顕微鏡で直接的に検出されるか、あるいはハプテン標識の場合、さらなる操作ステップによって免疫学的反応 (ELISA) において検出される。このような可視化は、通常、試料を、例えばナイロン膜上にまたはマイクロタイタープレート内の

液体均一相中で固定化することにより達成される。この追加のステップはかなり時間がかかり、高価である。したがって、このステップを省略することが望まれている。

【0017】適当なレーザーダイオードによるIR-蛍光標識核酸を直接的に励起することの可能性および上述の担体物質の自己蛍光に対する検出の不感受性により、簡単に費用に対して最も効率のよい装置を使用することができる。免疫学的検出反応は省略することができる。

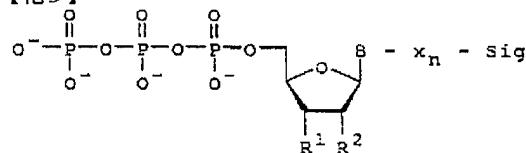
IR-標識核酸は、適当なスキャナーまたはマイクロタイタープレートリーダーの補助を伴うレーザー/検出器の併用によって光学的手段で簡単に検出される。

【0018】要約すると、本発明による赤外発蛍光団で標識したヌクレオシド5'-三リン酸をポリメラーゼ基質として使用すると、核酸への直接的な酵素の取り込み、ならびに配列決定のためにこのように標識された核酸を検出することが可能となり、そして、その使用はまた、この組み合わせにおいて新規であり、同時に本発明の一部をなすin situ ハイブリッド形成をも許容する。

【0019】本発明は、一般式：

【0020】

【化3】

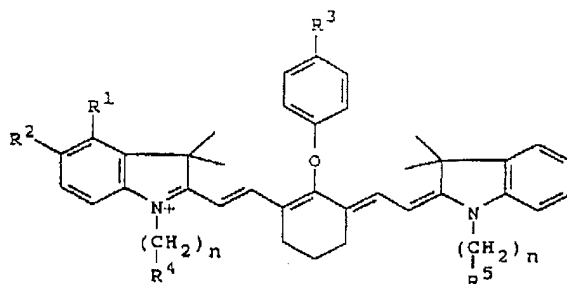


【0021】(式中、Bは複素環式塩基であるアデニン、グアニン、ヒポキサンチン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-グアニン、7-デアザ-ヒポキサンチン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-グアニン、7-デアザ-8-アザ-ヒポキサンチン、ならびにチミン、シトシンおよびウラシルを示し、Xはn=4~20原子の結合基を表し、Sigは650~800nmの励起波長をもつ蛍光分子を表し、R¹およびR²は、それぞれHおよび/またはOHを表す。) で表されるヌクレオシド-5'-三リン酸を提供する。

【0022】本発明の一態様において、上記の一般式中のBは上述したとおりであり、Xは好ましくはn=10~15原子の結合基を表し、Sigは一般式：

【0023】

【化4】



【0024】(式中、 R^1 および R^2 は、Hまたは共にフェニル残基を表し、 R^3 は、ヌクレオチドとの結合が R^4 部位を介する場合はHであり、結合が R^3 部位を介する場合は-NHCS-であり、 R^4 および R^5 は、それぞれ $n=3\sim5$ のアルキルスルホニルを示し、または、結合が R^4 部位を介する場合は R^4 は $n=3\sim8$ の-NHCS-、 R^5 は、 $n=3\sim5$ のアルキルスルホニルを示す。)で示されるカルボシアニオンを表す。

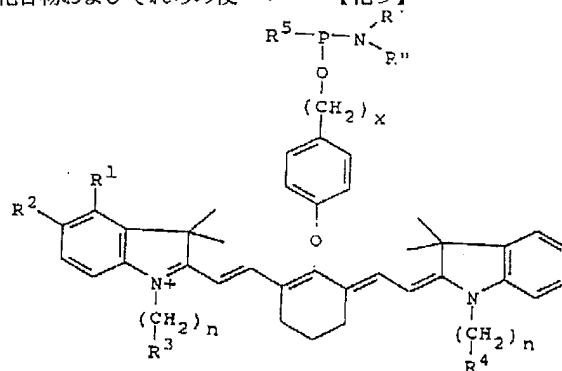
【0025】本発明は、また、DNAポリメラーゼの基質としての上記化合物およびそれらの使用、RNAポリ

* 用、核酸を標識するための上記化合物の使用、核酸を検出するための上記化合物の使用、DNA配列決定における上記化合物の使用およびin situ ハイブリッド形成において使用される上記化合物の使用に関する。ハイブリッド形成は膜上、溶液中またはマイクロタイタープレート内の溶液で行うとよい。

【0026】標識されたハイブリッドは適切なレーザーダイオードおよび検出器により検出できる。さらに、本発明は、一般式：

【0027】

【化5】



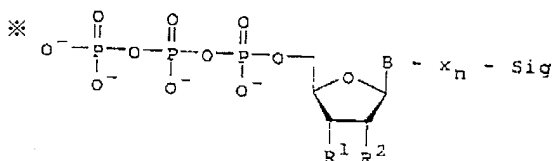
【0028】(式中、 R^1 および R^2 はHまたは共にフェニル残基を表し、 R^3 および R^4 はそれぞれ $n=3\sim5$ のアルキルスルホニルを示し、 R^5 はメトキシまたは2-シアノエトキシを示し、 R' および R'' はそれぞれエチルまたはイソプロピルを示し、 X は1~10を示す。)で表される化合物を提供する。本発明は、ホスホルアミダイト法によるオリゴヌクレオチド合成に使用する、上記化合物の使用、およびオリゴヌクレオチドの5'-標識のための上記化合物の使用にも関する。

【0029】

【発明の実施の形態】本発明の一般式：

【0030】

【化6】



40 【0031】で表されるヌクレオシド5'-三リン酸は、修飾されていないヌクレオシドから出発して周知の方法により製造される。これら、すなわちピリミジンヌクレオシドの場合はウリジン、チミジンおよびシチジン、およびプリンヌクレオシドの場合はアデノシンおよびグアノシン、ならびにそれに対応する7-デアザ-プリンおよび7-デアザ-8-アザプリンヌクレオシドは、適当な手法でC-5またはC-6 (ピリミジン)、C-8 (プリン)、C-8 (3-デアザ-プリン)、C-7またはC-8 (7-デアザ-プリン) の位置で化学的に修飾され、そして最終的に5'-リン酸化される。

【0032】修飾基は適当な長さのスペーサーおよび適当な活性化された蛍光染料（例えば、イソチオシアン酸塩またはN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの形）で置換され得る末端第一級または第二級アミノ基から構成されることが都合がよい。そのような蛍光染料は活性化された形、すなわち、例えば、アミノ基とよく反応する形、好ましくはイソチオシアン酸塩として使用される。その反応が完了した後、その発蛍光団はヌクレオチドの修飾基にNHCS基を介して共有結合される。

【0033】このようにして修飾されたヌクレオチドのリン酸化は、文献〔すなわち、Yoshikawa, M. ら (1967) Tetrah. Lett. 50, 5065〕に記載された公知の方法にしたがって三塩化リンと反応させて一リン酸塩を生成させ、次いでピロリン酸と反応させて所望の5'-三リン酸塩を生成させることにより行われる。またそれに代わる方法として、予め生成させたヌクレオチド5'-三リン酸の直接修飾も可能である。

【0034】発蛍光団は近赤外領域、すなわち600~800 nmの間に吸収をもつ化合物である。例えば、カルボシアニンなどの630nm~780nmの化合物が好ましい。すでに上記したように、ポリメラーゼを用いて標識ヌクレオチドを取り込ませるための上記の方法に加えて、標識オリゴヌクレオチド、いわゆるプライマーの使用に基づくさらなる方法が一般的である。すでに言及したように、多段階反応におけるこれらの分子の通常の合成はきわめて時間がかかる。この方法において、オリゴヌクレオチド合成が完了した後、追加のステップにおいてシグナル基をオリゴマーの5'-末端に結合させなければならない。実際のオリゴヌクレオチド合成は自動合成装置で行われるので、シグナル基の結合のステップもすでにその合成装置内で行うことが可能になることも強く望まれている。該オリゴヌクレオチド合成は単量体構成単位を少しずつ結合させること、いわゆるヌクレオチドホスホリアミダイトから構成されるので、本発明のさらなる目的は自動オリゴヌクレオチド合成における最終ステップとしてシグナル基の直接取り込みを可能にする発蛍光団ホスホリアミダイトを開発することであった。そのようなNIR-染料-ホスホリアミダイトは今まで知られておらず、発明的に新規である。

【0035】本発明を下記の実施例によってさらに詳細に説明する。

【0036】

【実施例】実施例1

5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸

この誘導体は Langer らのProc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78, 6635の記載にしたがって合成した。

実施例2

無水-11-フェノキシ-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-4,5-ベンズインド-インドトリカルボシアニン

-1-(4-スルホブチル)-1'-(3-アミノプロピル)-チオノ-[5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸]

ジメチルホルムアミド1 ml中の無水-11-フェノキシ-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-4,5-ベンズインド-1-(4-スルホブチル)-1'-(3-イソチオシアノプロピル)-インドトリカルボシアニンNa塩 50mg の溶液を、0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.5) 2 ml中の5-アミノアリル-dUTP-Li₄ 33mg(60 μmol)の溶液に添加して、その反応混合物を遮光しながら室温で約15時間放置した。その後、濾紙電気泳動(0.05Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5)によれば、出発物質の大部分が反応していた。所望の物質を単離するために、反応混合物を水約50 mlで希釈して、深緑色の溶液を塩化物型のDEAE Sephadex A-25を含むイオン交換カラムに注いだ。生成物を、1 M LiClに対する水の直線グラジエントでカラムから溶離し、生成物画分を減圧で濃縮して、RP18物質上の逆相クロマトグラフィーによって脱塩した。凍結乾燥後、所望の三リン酸塩6 μmol(10%)を得た。

【0037】スペクトルデータ：Emission_{max} 786 nm、720 nm(肩)、238 nm

実施例3

無水-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-1,1'-ビス(3-スルホブチル)-インドトリカルボシアニン-11-(4-アミノ)-フェノキシチオノ-[8-(5-アミノペンチルアミノ)-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸] (「IR D-dATP」)

この誘導体は、8-アミノペンチルアミノ-dATP 38mg (60 μmol)および無水-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-1,1'-ビス(3-スルホブチル)-11-(4-イソチオシアノ)-フェノキシインドトリカルボシアニンNa塩50mg (60 μmol)から、実施例2で述べた方法にしたがって調製した。化合物3 μmol が得られた。

【0038】スペクトルデータ：Emission_{max} 770 nm、697 nm(肩)、279 nm

実施例4

T7-DNAポリメラーゼの基質としてのIRD-dATPの使用

鋳型DNA 3 μgを、反応緩衝液(200mM トリス-HCl、pH7.5、100mM MgCl₂、250mM NaCl) 2 μl、M13/pUC プライマー1 pMおよびH₂O 7 μlの混合物中で37°Cで15分間インキュベートした。

【0039】DTT 1 μl(100mM)、標識混合物(IRD 40-dATP 10 μM、dCTP、dGTPおよびdTTPをそれぞれ1 μM) 2 μl、H₂O 1 μl およびT7-DNAポリメラーゼ2 μl(2.5 U/μl)を標識反応のために添加して、室温で10分間インキュベートした。続いて、DNA配列決定に使用するために、終止混合物(ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP)を添加することにより終止反応を行った。

実施例5

無水-11-フェノキシ-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テト

ラメチル-4,5-ベンズイ

ンド-インドトリカルボシアニン-1-(4-スルホブチル)-
1'-(3-アミノプロピル)-チオノ-[5-(3-アミノアリル)-
ウリジン-5'-三リン酸]

この化合物は5-アミノアリル-UTP (実施例1にしたがっ
て調製した) および対応するイソチオシアン酸塩から実
施例2と同様にして合成した。

【0040】スペクトルデータは実施例2の2'-デオキ
シ化合物と一致する。

実施例6

無水-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-1,1'-
ビス(3-スルホプロピル)-インドトリカルボシアニン-11-
(4-アミノ)フェノキシチオノ-[5-(3-アミノアリル)-
2',3'-ジデオキシウリジン-5'-三リン酸] (「IRD-ddU
TP」)

ステップ1: 2',3'-ジデオキシウリジン-5'-三リン酸
この誘導体は、市販の2',3'-ジデオキシシチジン-5'-
三リン酸 (ペーリンガー マンハイム) をNaNO₂/酢酸で
脱アミノ化することから出発する不安定なジアゾニウム
誘導体を介して合成した。

【0041】ステップ2: 5-(3-アミノアリル)-2',3'-
ジデオキシウリジン-5'-三リン酸

この化合物は、Langerらにしたがって、2',3'-ジデオキ
シ-UTPの5-水銀誘導体を介して実施例1と同様にして調
製した。

ステップ3: 「IRD-ddUTP」

このジデオキシ誘導体は、実施例2にしたがって5-アミ
ノアリル-ddUTPとそれに対応するイソチオシアン酸塩と

を反応させることにより得られた。

【0042】そのスペクトルデータは実施例3の2'-デ
オキシ化合物のものと一致する。

実施例7

無水-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル-1,1'-
ビス(3-スルホプロピル)-インドトリカルボシアニン-1
1-[(4-エトキシ)フェノキシ-0-(2-シアノエチル)-N,N-
ジイソプロピルホスホルアミダイト

50ml丸底フラスコ中で、無水-11-(4-ヒドロキシエチル)
フェノキシ-10,12-プロピレン-3,3,3',3'-テトラメチル
-1,1'-ビス(3-スルホプロピル)-インドトリカルボシア
ニン-11-ヒドロキシドのNa塩 425mg (0.5mmol) を、
乾燥アセトニトリル5mlに溶解し、エチルジイソプロピ
ルアミン 0.275ml (1.6mmol) を添加した。次いで、クロ
ロ-β-シアノエトキシ-N,N-ジイソプロピルアミノホス
ファン0.125mlを窒素下、攪拌しながら約3分以内に滴
下添加した。さらに室温で30分間攪拌し、次に、5%Na
HCO₃水溶液10mlを添加し、続いてジクロロメタン約10ml
をそれぞれ用いて2回抽出を行った。溜まった有機相を
硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を蒸留により除去し
て、残留物を移動溶媒ジクロロメタン/酢酸エチル/ト
リエチルアミン 45:45:10 を用いてシリカゲルにおける
クロマトグラフィーにかけた。

【0043】収量は 480mg (理論値に対して88.7%) で
あった。

TLC (シリカゲル、上記の移動溶媒) R_f=0.4

³¹P-NMR (d₆DMSO): 149 および153ppm (2ジアステ
レオマー)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

G01N 33/58

// C12N 15/09

G01N 21/78

F I

G01N 33/58

A

21/78

C

C12N 15/00

A

(72)発明者 ビルクナー、クリスチャン

ドイツ連邦共和国 デー-82449 ウフ

ィンク ヴィリンクシュトラ-セ 9番地

(72)発明者 フォン デル エルツ、ハーバート

ドイツ連邦共和国 デー-82362 ヴァ

イルハイム、イン デル アオ 21番地